

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
27. März 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/025567 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/53

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/03414

(22) Internationales Anmeldedatum:  
13. September 2002 (13.09.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 45 226.8 13. September 2001 (13.09.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): BERNARD, André [DE/DE]; Hafengasse 11, 72070  
Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DÜBEL, Stefan  
[DE/DE]; Im Langgewann 6a, 69221 Dosenheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PRODUCTION OF SUPPORT-BONDED MOLECULES

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG VON TRÄGERGEBUNDENEN MOLEKÜLEN

(57) Abstract: The invention relates to a support for binding assays, whereby the assignment and coupling of trap molecules occurs on the solid phase by simple coating of a surface (support), pretreated in a determined manner, with a solution which contains a mixture of specially derivatised targets (trap molecules). The assignment of a particular molecule to a particular location on the support is guaranteed by a system of tagging molecules ("tags"), recognized by receptor molecules arranged in a determined manner on said support. These tags and their receptor molecules are typically nucleic acid fragments, but can also correspond to other molecule categories, in particular leucine zippers, antigen-antibody pairs or other protein pairs. The present invention also relates to a method for the production of such supports and trap molecules, as well as the application thereof after coupling.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung beschreibt Träger für Bindungsassays, bei dem die Zuordnung und Kopplung von Fängermolekülen an die Festphase durch einfaches Übersichten einer in bestimmter Weise vorbehandelten Fläche (Träger) mit einer Lösung geschieht, welche ein Gemisch speziell derivatisierter "Targets" (Fängermoleküle) enthält. Die Zuordnung eines bestimmten Moleküls zu einem bestimmten Platz auf dem Träger wird durch ein System von Markierungsmolekülen ("Tags") gewährleistet, welche von in bestimmter Form angeordneten Rezeptormolekülen auf dem Träger erkannt wird. Diese "Tags" und ihre Rezeptormoleküle sind typischerweise Nukleinsäurestücke, können aber auch andere Molekülklassen sein, insbesondere Leucin- zipper, Antikörper-Antigen-Paare oder andere Proteinpaare. Die Erfindung beschreibt weiterhin Verfahren zur Herstellung solcher Träger und der Fängermoleküle, sowie deren Anwendung nach der Kopplung.

WO 03/025567 A2

„Herstellung von trägergebundenen Molekülen“

Zweck der Erfindung:

- 5 Proteomics und Genomics erfordern immer komplexere Bioarrays zur hochparallelen Analyse komplexer Gemische von Biomolekülen. Die Herstellung solcher Bioarrays, im besonderen von Protein-Arrays wie z.B. Antikörperarrays, erfolgt nach Stand der Technik entweder aufwendig durch einzelnes (serielles) Aufbringen der „Target“-Moleküle z.B. mithilfe von Spottern oder Druckern, oder durch kombinatorische
- 10 Synthese aus Monomeren in einem seriellen Prozess für jeden Syntheseschritt. Eine wesentliche Erleichterung der Produktion solcher Bioarrays und damit eine preiswertere Herstellung würde durch einen nicht-seriellen Aufbringungsschritt der Proteine ermöglicht. Damit bei einem solchen Verfahren eine genaue Positionszuordnung des einzelnen Proteins zu einer bestimmten Stelle des Arrays
- 15 möglich ist, mußten bisher extrem aufwendige und nicht mit hoher Komplexität herstellbare Mikrokanal-Festkörper eingesetzt werden, welche verschiedene Flüssigkeitszuführungen für verschiedene Positionen auf dem Array gewährleisten.

Diese Erfindung beschreibt ein Verfahren, bei dem die Zuordnung der „Target“-

- 20 Proteine durch einfaches Übersichten einer in bestimmter Weise vorbehandelter Fläche (Träger) mit einer Lösung geschieht, welche ein Gemisch speziell derivatisierter „Target“-Proteine enthält. Die Zuordnung eines bestimmten Proteins zu einem bestimmten Platz auf dem array wird durch ein System von

Markierungsmolekülen (im weiteren als „tags“ bezeichnet) gewährleistet, welche von in bestimmter Form angeordneter Rezeptormoleküle auf dem Träger erkannt werden (Figs. 1 und 2). „Tags“ und ihre Rezeptormoleküle sind typischerweise Nukleinsäurestücke, können aber auch andere Molekülklassen sein, insbesondere

5 Leuci, zipper, Antikörper-Antigen-Paare oder andere Proteinpaare.

Die Erfindung ermöglicht insbesondere ein Verfahren zur preiswerten Herstellung einer großen Zahl verschiedener Bindemoleküle (insbesondere von Antikörpern, synthetischen Bindemolekülen wie Einzeldomänenantikörpern, Anticalinen, RNA-

10 Aptameren und ihrer Derivate, Fibronectin-Domänen mit randomisierten Loopbereichen) mit daran gebundenem „tag“ in einem Gemisch, aus dem danach spezifische Bindemoleküle isoliert werden und bereits mit einem eindeutigen „tag“ versehen sind. Zur Herstellung eines Arrays mit bekannter Anordnung von Proteinen muß dann nur noch die Verknüpfung der Bindungsspezifität des Bindemoleküls mit  
15 seiner „tag“-Sequenz bekannt sein. Diese Verknüpfung ist insbesondere durch DNA-Sequenzierung von durch Bindung selektierten Klonen einfach erhältlich. Der gesamte Herstellungsvorgang einer komplexen Mischung von typischerweise 20-200000 verschiedenen Bindeproteinen erfordert dabei lediglich 2 Analyseschritte: die Überprüfung der Bindungsfähigkeit des Bindeproteins (1) und die Sequenzierung des  
20 „tags“

Der Schlüsselvorgang dabei ist die Kopplung von „tag“ und Bindeprotein während der Synthese des Bindeproteins. Eine eindeutige Zuordnung bei einer solchen

Kopplung wird dadurch gewährleistet, daß die Nukleinsäure, welche für das Bindeprotein codiert, an das fertige Bindeprotein gebunden wird, nachdem dieses fertig synthetisiert wurde. Ein solcher Vorgang ist z.B. in Form des Ribosomal Display (Roberts und Szostak, PNAS USA Vol 94, pp. 12297-12302, 1997)

- 5 beschrieben – hier erzeugt ein Puromycin am 3'-Ende der RNA eine kovalente Bindung zu dem von dieser RNA translatierten Polypeptid. Um störende Wechselwirkungen des für das Bindeprotein codierenden, langen Nukleinsäurestranges bei der später vorgesehen Hybridisierung der „tag“-Sequenz zu unterbinden, wird in einem weiteren Schritt eine Verkürzung der gekoppelten RNA durchgeführt, welche
- 10 lediglich die „tag“-Sequenz und kurze flankierende Regionen, gekoppelt an das Polypeptid, übrig läßt.

- Zur Herstellung des Proteinarrays nach Selektion og. Bindungsprotein-„tag“-Paare für die nachzuweisenden Liganden (8) wird eine komplexe Mischung von
- 15 Bindungsprotein-„tag“-Komplexen (mit unterschiedlicher Bindungsspezifität) über einen nach Stand der Technik hergestellten Oligonukleotidarray überschichtet, dessen Oberfläche an definierten Stellen mit zu den in der Mischung von Bindungsprotein-„tag“-Komplexen komplementären Nukleotidsequenzen beschichtet ist. Durch Hybridisierung von „tag“ und Gegenstrang wird eine Ortsbekannte Kopplung der
- 20 Bindeproteine an den Array erreicht.

Dieser Array kann dann zum Nachweis von Liganden (8) in einer Probe eingesetzt werden, insbesondere durch die Verwendung direkt (oder in mehreren Schritten

indirekt) Fluoreszenz- oder Enzym-markierten Liganden, Plasmonresonanz oder anderen Detektionsverfahren nach Stand der Technik.

Der erfindungsgemäße Produktionsprozess eines Mikroarrays von Proteinen bietet

- 5    signifikante Einsparungen gegenüber bestehenden Methoden, da er
- lediglich zwei Analyseschritte (Bindungsassay und Sequenzierung einer kurzen Nukleinsäuresequenz) zur Definition des Bindungsprotein-, „tag“-Paares erfordert,
  - in einem Schritt durch einfaches Inkubieren in einem Gemisch von Bindungsprotein-, „tag“-Paaren hergestellt wird.
- 10   -   Zudem kann in einer Ausführungsvariante komplett in vitro durchgeführt werden (Selektion aus kombinatorischen Genbibliotheken)

Damit wird der bisher sehr aufwendige Weg zu hochkomplexen Protein-Arrays durch Vermeidung des bisher notwendigen sequenziellen Aufbringens der verschiedenen

- 15   Bindungsproteine („spotten“) deutlich vereinfacht.

#### Beispiel 1: Herstellung eines Proteomic-Microarrays

Mithilfe kombinatorischer Methoden nach Stand der Technik werden hochkomplexe

- 20   (über  $10^{10}$  verschiedene Sequenzen) Ribosomal-Display-Genbibliotheken von Fibronectin-Domänen-Analogen mit randomisierten Loop-Bereichen hergestellt. Solche Genbibliotheken werden z.B. von der Fa. Phyllos, Lexington, Massachusetts, USA, hergestellt. In einem zweiten Klonierungsschritt werden einige Nukleotide in

- Leserichtung hinter dem Translations-Stopcodon des offenen Leserasters, welcher für die Fibronectin-Domänen-Analogen mit randomisierten Loop-Bereichen codiert, eine zweite randomisierte Region einkloniert. Diese wird durch Polymerase-Kettenreaktion mit einem in der mittleren Region randomisiert synthetisierten
- 5 Oligonukleotid als Template und 2 Primern, welche an die beiden nichtrandomisierten Enden des Templates hybridisieren, hergestellt und mittels Restriktionsverdau einkloniert (eine andere Möglichkeit für die Herstellung mehrfach randomisierter Sequenzen ist in Hayashi et al., (1994, BioTechniques Vol.17, pp310-313) beschrieben). Die Länge der randomisierten Nukleotidsequenz ist dabei so gewählt,
- 10 daß die entstehende theoretische Komplexität (Anzahl aller möglicher verschiedener Kombinationen dieser Nukleotide) größer ist als die der Genbibliothek von Bindeproteinen, die weiter vorne auf der Nukleinsäure codiert ist. Zwischen den beiden Genbibliotheken liegt eine Linker-Sequenz, welche später zum Abschneiden unnötiger RNA dient. Mit dem entstehenden DNA-Konstrukt (Fig. 3) wird ein
- 15 Ribosomal-Display-Vorgang nach Stand der Technik (US Patent App. 6258558) durchgeführt und so viele verschiedene (typischerweise 20 – 500 000) Binder gegen die unterschiedlichen Proteine einer Zelle hergestellt.

- Im weiteren Verlauf wird die Bindungsaktivität der durch das Ribosomal Display
- 20 selektierter Klone durch einen Bindungsassay (z.B. ELISA, Immunoblot, Plasmon-Resonanz-Analyse) festgestellt und die Nukleotid-Sequenz der dazugehörigen Nukleinsäure im Bereich der „tag“-Sequenz bestimmt. Da die theoretische Komplexität der „tag“-Sequenzen größer, im Idealfall mehrere Größenordnungen

größer ist als die der Genbibliothek von Bindeproteine, ist gewährleistet, daß mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit jedes Bindeprotein ein individuelles „tag“ besitzt. Die Sequenzinformation dieser Tags wird eingesetzt, Oligonukleotid-Arrays mit ihrem komplementären Strängen zu generieren, z.B. nach den bekannten Verfahren der

5 Firmen Affymetrix, USA, oder Febit AG, Mannheim.

Aus den charakterisierten Klonen wird nun in einem zweiten, dem Ribosomal Display ähnlichen, diesmal aber präparativen Schritt das mit dem „tag“ versehene

Bindemolekül hergestellt. Im Detail werden dazu mit Puromycin verbundene mRNA-

10 Moleküle hergestellt und eine in-vitro-Translation durchgeführt. Die erforderliche zellfreie Translation kann zur Erleichterung der Reinigung nach Shimizu et al., Nature Biotech Vol 19, p. 751-755, 2001) durchgeführt werden. Sie kann auch in einem Gemisch aller Bindemoleküle geschehen, was den enormen Aufwand einzelner Präparationen für jeden Klon einspart. Da die „tag“-Sequenz hinter dem Translations-

15 Stoppsignal liegt, wird automatisch ein „tag“ an jedes Bindeprotein angehängt.

Um störende Wechselwirkungen des für das Bindeprotein codierenden, langen

Nukleinsäurestranges bei der später vorgesehen Hybridisierung der „tag“-Sequenz zu unterbinden, wird nach Reinigung der „tag“-Bindeprotein-Komplexe aus der

20 Translationsreaktionsmischung eine Verkürzung der gekoppelten RNA durchgeführt, welche lediglich die „tag“-Sequenz und kurze flankierende Regionen gekoppelt an das Polypeptid übrig läßt. Eine solche Verkürzung kann nach Stand der Technik auf verschiedene Weise erfolgen. Es kann ein kurzes (typischerweise 5-20nt langes)

- Oligonukleotid, welches komplementär zur Linker-Region (10) ist, an diese hybridisiert werden, nachdem die Selektion anhand der Bindung der Bindeproteine durchgeführt wurde. Dadurch wird diese kurze Region schneidbar durch bestimmte Nukleasen, insbesondere RnaseH (Fig. 4). Eine andere Möglichkeit, eine solche Verkürzung durchzuführen, ist die Verwendung von nukleaseresistenten Formen der RNA statt der für den Selektionsprozess für die Bindemoleküle; in diesem Falle würde die Nukleinsäurederivate, welche analog zur mRNA eingesetzt werden, so synthetisch hergestellt, daß die Linker-Region (10) aus nicht nukleaseresistenten Nukleotiden oder DNA besteht, während der Rest der Sequenz aus nukleaseresistenten Nukleotiden besteht (z.B. PNA oder Nukleinsäurestränge aus SP-Diastereomeren von Ribonucleosid-5'-O-(1-Thiotriphosphaten)) (Fig. 5).

- Nach Verkürzung der Nukleinsäure wird das Gemisch aus Bindeprotein-„tag“-Komplexen einer säulenchromatographischen Reinigung auf einem Ionentauscher-Material unterzogen, um die abgespaltenen Sequenzen zu entfernen. Das so gereinigte Gemisch wird auf einen Array aufgetragen und bei 67°C für 24 Stunden inkubiert, sodaß sich die nichtkovalenten Bindungen zwischen „tag“ und seiner Rezeptorsequenz ausbilden können. Der Array wird 5 mal mit PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) gewaschen, um nicht gebundene Bindemoleküle zu entfernen, und kann dann sofort für eine Bindereaktion zum Nachweis von Liganden in einer Probe eingesetzt werden. Einen Überblick über den ganzen erfindungsgemäßen Weg zur Herstellung einem Proteomics-Chips gibt Fig. 6.



## Beispiel 2

## Herstellung eines Antikörper-Arrays

- 5 Nach Stand der Technik wird ein Oligonukleotidarray hergestellt, auf welchem 10 000 für eine optimale Bindung und minimale Kreuzhybridisierung optimierte Oligonukleotide an bekannten Positionen aufgebracht wurden.

- Eine Genbibliothek von ScFv-Antikörperfragmenten im Phagendisplay-vektor
- 10 pSEX81 wird auf den gewünschten Antigenen gescreent und die gewünschten Binder nach Stand der Technik kloniert (Welschof, et al., (1997) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 94, 1902-1907). Durch Umklonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pSTE (Dübel et al., J. Immunol. Meth. 178, 201-209) werden Streptavidin-Fusionsproteine der selektierten Antikörperklone hergestellt. Der pSTE-Vektor wurde vor dem
- 15 Einsetzen der Gene für die ScFv-Antikörperfragmente durch Insertion einer kurzen Nukleinsäuresequenz hinter dem Stopcodon für das Streptavidin verändert, welche gewährleistet, daß später an dieser Stelle die translatierte RNA abgeschnitten werden kann (s. Beispiel 1)) Die für die Antikörper-Streptavidin-Fusionsproteine codierenden DNA-Stücke werden inklusive dieser Linker-Sequenz aus E. coli-
- 20 Plasmid-DNA-Präparation durch Restriktionsverdau gewonnen. Die ausgeschnittenen Genstücke, enthaltend die kodierende Sequenz für das Antikörper-Streptavidin-Fusionsprotein und die Linkersequenz, werden in einzelnen Ligation mit jeweils einer spezifischen Tag-Sequenz verbunden. Die dazu verwendeten doppelsträngigen

- Oligonukleotide wurden durch Hybridisierung von zwei komplementären synthetischen Oligonukleotiden hergestellt, wobei das entstehende Dopplestrang-Nukleinsäurestück an dem nicht zu ligierenden Ende mit einer Biotin-Gruppe derivatisiert ist. Die Ligationsprodukte werden durch Ethanolfällung gereinigt und
- 5 konzentriert und dienen als Template in einer Ribosomen-Display-Reaktion nach Hanes und Plückthun (1997, Proc Natl Acad Sci U S A 13;94(10):4937-42). Während der dazugehörigen in vitro Translation koppelt das biotinylierte Ende der Nukleinsäure an das Antikörper-Streptavidin-Fusionsprotein, welches von diesem Ribosom hergestellt wurde, und bewirkt die Ausbildung des Bindemolekül-„tag“-
- 10 Paares.

Die weitere Prozedur wird entsprechend Beispiel 1 durchgeführt.

## Abbildungsbeschreibungen:

Fig. 1: Immobilisierung des Bindungsproteins (1) durch Hybridisierung des „tags“  
(4) mit einem Rezeptormolekül (z.B. einem Nukleinsäuregegenstrang) (5), welcher  
5 über ein Bindungselement (6) auf dem Array verankert ist.

Fig.: 2 Der Immobilisierung auf dem Array nachfolgende kovalente Verknüpfung (7)  
(2 verschiedene Möglichkeiten der Bindung sind angezeigt) mit diesem und  
darauffolgender Nachweis einer Probe (8) durch Bindung an das immobilisierte  
10 Bindungsprotein (1); die Bindung der Probe (8) erzeugt dabei ein detektierbares  
Signal, z.B. Fluoreszenz, Änderung der Reflektionseigenschaften, der Leitfähigkeit,  
der Masse oder der Plasmonresonanzeigenschaften.

Fig. 3. mRNA-Strang mit genetischen und molekulare Elementen der Genbibliothek  
15 für das “Ribosomal Display”.

Dabei sind:

9 Genetische Bibliothek, codiert für Bindemoleküle

10 linker, der das Abschneiden ermöglicht

11 Genetische Bibliothek randomisierter Nukleotide (“tag”-Bibliothek)

20 12 Puromycin-Gruppe

13 nicht notwendigerweise sequenzidentische Spacersequenzen

Fig. 4: Abspaltung nach der Selektion nicht mehr benötigter Nukleinsäuresequenzen durch Hybridisierung eines Oligonukleotides und nachfolgendem Nukleaseverdau.

14 Gegenstrang-Oligonukleotid zur Linker-Region (10)

- 5 Fig. 5: Abspaltung nach der Selektion nicht mehr benötigter Nukleinsäuresequenzen durch Einbau eines nicht nukleaseresistenten Nukleinsäurestückes und nachfolgendem Nukleaseverdau.

15 nicht nukleaseresistenten Nukleinsäurestück in der Linker-Region (10)

16 nukleaseresistente „tag“-Region

- 10 17 für das Bindeprotein (1) codierende Nukleinsäureregion

Fig. 6 Herstellung eines Protein-Arrays nach Beispiel 1

15

Ansprüche:

1. Trägergebundene Molekülanordnungen für die chemische, biochemische oder biomedizinische Analytik, dadurch gekennzeichnet, daß

5

a) das an einen Träger (2) zu bindende Bindungsmolekül (1) über eine kovalente oder nichtkovalente Bindung (3) an ein „tag“ (4) gebunden ist. Dieses wird von einem Rezeptormolekül (5) erkannt, welches seinerseits über eine kovalente oder nichtkovalente Bindung (6) an einen Träger (2) gebunden ist.

10

b) ~~es~~ diese Moleküle Arrays biologischer oder chemischer Substanzen bilden, dadurch gekennzeichnet, daß verschiedene Moleküle (1) an verschiedene „tags“ (4) gebunden sind, wobei jeweils eine bestimmte typische Zusammensetzung des „tags“ (4) für ein bestimmtes Molekül (1) gegeben ist und das „tag“ somit eine Identifikation (analog zu einem Namenschild oder einer Nummer) für das Molekül (1) darstellt. Der Array von verschiedenen Molekülen (1) an für jedes der verschiedenen Moleküle (1) definierten Positionen wird dann durch Mischen einer Molekülbibliothek bestehend aus Molekülkomplexen von Molekül (1) und „tag“ (4), verbunden durch (3) und einem vorgefertigten Array auf einem Träger (2), auf dem die Rezeptormoleküle (5) durch Bindung (6) in definierter Anordnung aufgebracht sind, sich durch Bindung von „tag“ (4) an Rezeptormolekül (5) ausbilden.

15

20

c) ~~daß~~ die Molekülkomplexe von Molekül (1) und „tag“ (4), verbunden durch (3), während eines biochemischen Prozesses, insbesondere enzymatischer Reaktionen, Translation, Transkription, Polymerisation oder Replikation, hergestellt werden, sodaß eine Zuordnung eines bestimmten „Tags“ (4) zu einem bestimmten Molekül (1) erzeugt wird.

2. Trägergebundene Molekülanordnungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das „tag“ (4) eine Nukleinsäure, oder ihr Derivat, insbesondere DNA, RNA oder ihren nukleaseresistenten Derivaten wie PNA oder thioRNA, enthält und das Rezeptormolekül (5) einen dazu komplementären Gegenstrang einer Nukleinsäure, oder ihres Derivats, insbesondere DNA, RNA oder ihren nukleaseresistenten Derivaten wie PNA oder thioRNA, enthält.

3. Trägergebundene Molekülanordnungen nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Molekülkomplexe aus Molekül (1) und „tag“ (4), verbunden durch (3), durch eine zusätzliche Bindung (7), welche während oder nach der Ausbildung der Bindung zwischen „tag“ (4) und Rezeptormolekül (5) erfolgt, zusätzlich auf dem Träger stabilisiert werden.

4. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere zusammenhängenden Flächen mit Bindemolekülen beschichtet werden, wobei die einzelne mit Bindemolekülen beschichtete Fläche von nicht mit

Bindemolekülen beschichtete Flächen umgeben ist und eine einzelne mit

Bindemolekülen beschichtete Fläche jeweils weniger als 100 Mikrometer x 100

Mikrometer bedeckt, insbesondere weniger als 10 x 10 Mikrometer.

- 5 5. Trägergebundene Molekülanordnungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß nachweisbare Probenmoleküle (8) mit der
- trägergebundenen Molekülanordnung in einer Weise in Kontakt gebracht werden, die einen nachfolgenden Nachweis gebundener Probenmoleküle (8) mithilfe optischer Verfahren ermöglicht, insbesondere durch resonante oder nichtresonante optische
- 10 Effekte wie Spiegelung, Brechung, Plasmon-Resonanz, Streuung, Beugung, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Lumineszenz, Änderung der Polimersisationsebene, Änderung der Absorption oder Transmission, Phasenverschiebung oder Quenching.

6. Trägergebundene Molekülanordnungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß nachweisbare Probenmoleküle (8) mit der
- 15 trägergebundenen Molekülanordnung in einer Weise in Kontakt gebracht werden, die einen nachfolgenden Nachweis gebundener Probenmoleküle (8) mithilfe elektromagnetischer Verfahren auslesbar ist, insbesondere durch magnetische Effekte, elektrostatische Effekte, Resonanzfrequenzänderung bei Massenänderung, Hall-Effekt
- 20 oder Leitfähigkeits- Widerstands- oder Kapazitätsänderungen.

7. Gerät zur Herstellung eines Trägers nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Schritte, aber nicht notwendigerweise alle Schritte, welche

zur Bildung der Träger notwendig sind, unter definierten Umgebungsbedingungen durchgeführt werden sowie vorzugsweise halbautomatisch oder automatisch durchgeführt werden.

- 5 8. Gerät zur Analyse von molekularen Bindungsreaktionen an einem Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Bindung von Probenmolekülen (8) mithilfe optischer Verfahren durchgeführt wird, insbesondere resonanter oder nichtresonanter optischer Effekte wie Spiegelung, Brechung, Plasmon-Resonanz, Streuung, Beugung, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, 10 Lumineszenz, Änderung der Polimersisationsebene, Änderung der Absorption oder Transmission, Phasenverschiebung oder Quenching.

9. Gerät zur Analyse von molekularen Bindungsreaktionen an einem Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Bindung 15 von Probenmolekülen (8) mithilfe elektromagnetischer Verfahren durchgeführt wird, insbesondere durch magnetische Effekte, elektrostatische Effekte, Resonanzfrequenzänderung bei Massenänderung, Hall-Effekt oder Leitfähigkeits-Widerstands- oder Kapazitätsänderungen.

- 20 10. Gerät zur Analyse von molekularen Bindungsreaktionen an einem Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, insbesondere zur Anwendung in biochemischen Labors, in Labors von Arztpraxen und Krankenhäusern sowie in allen Bereichen des Umweltschutzes, der Qualitätskontrolle, der Biotechnologie, Forensik, Agrar- und



Pflanzenhybridanalytik, sowie der molekularbiologischen, pharmazeutischen und medizinischen Forschung und Entwicklung.

11. Kit, enthaltend die wesentlichen Substanzen zur Durchführung einer oder  
5 mehrerer Analysen mit den in den Ansprüchen 1 bis 10 beschriebenen Trägern und Geräten.

12. Verfahren zu Herstellung trägergebundener Molekülanordnungen für die chemische, biochemische oder biomedizinische Analytik nach Fig. 6.

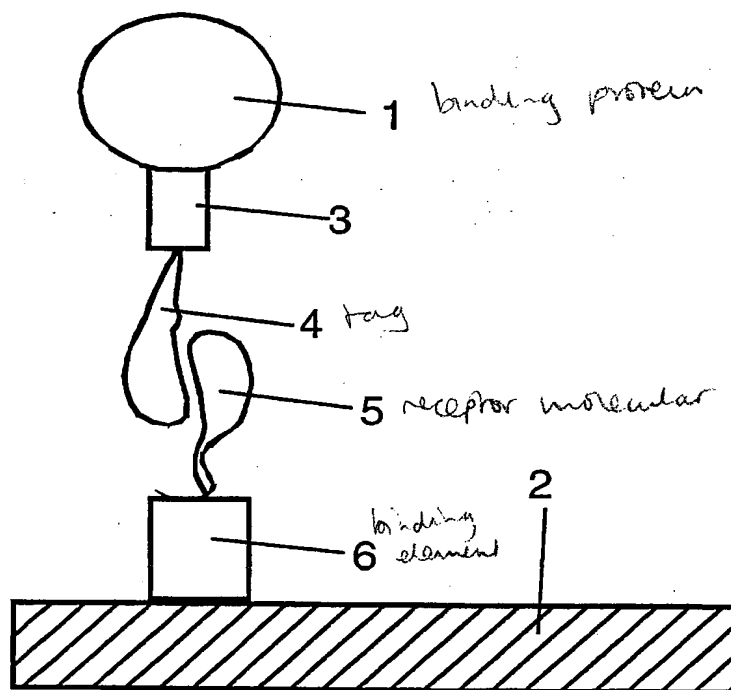


Fig. 1

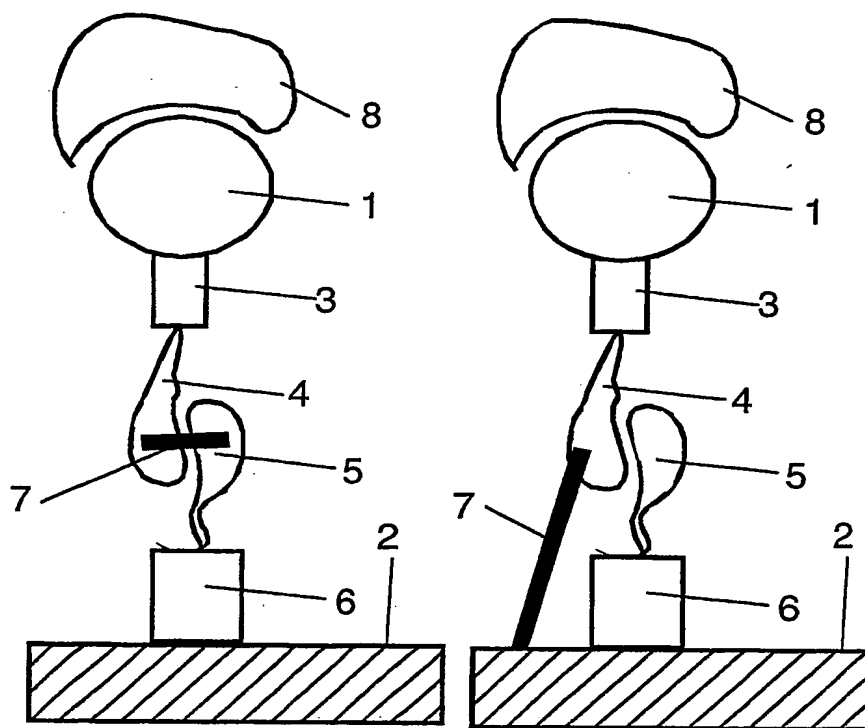


Fig. 2

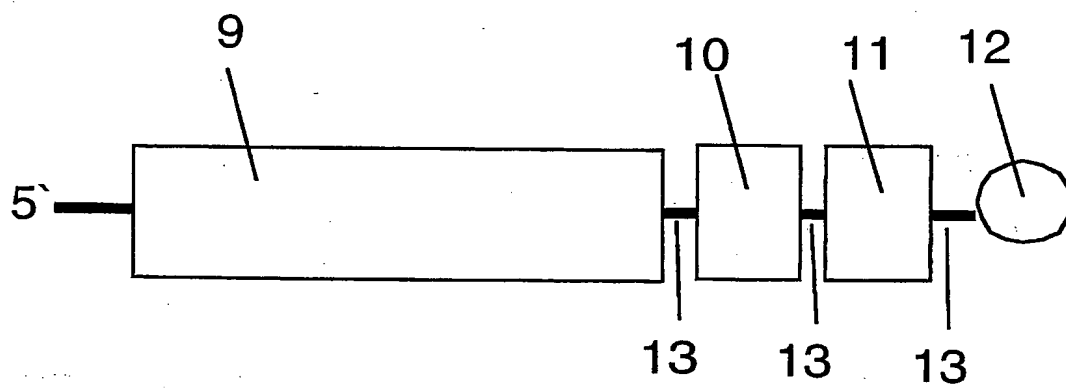


Fig. 3

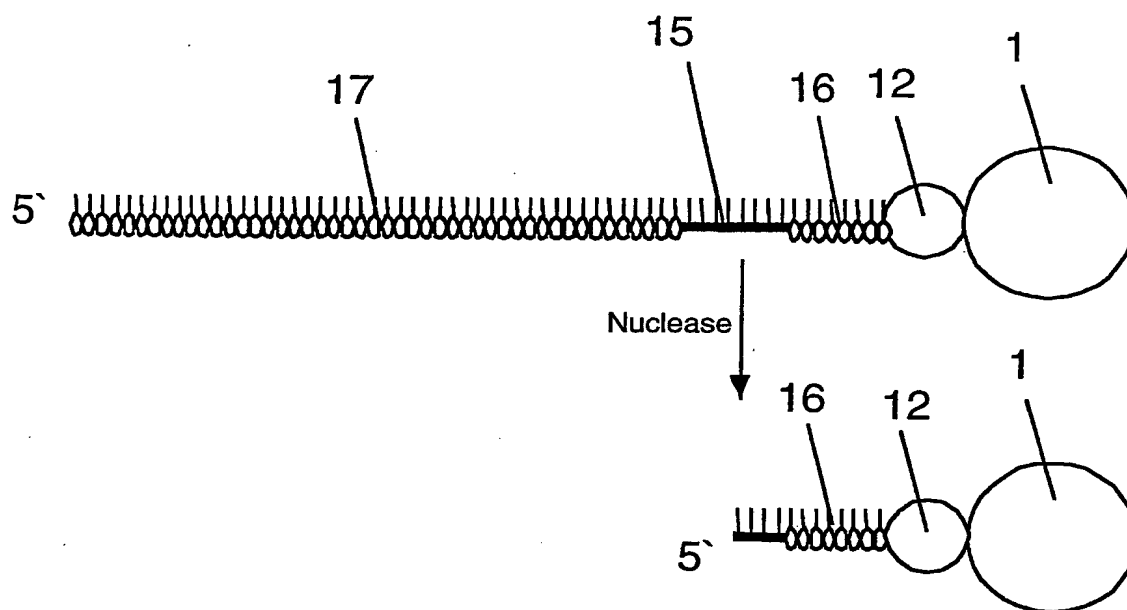


Fig. 4:

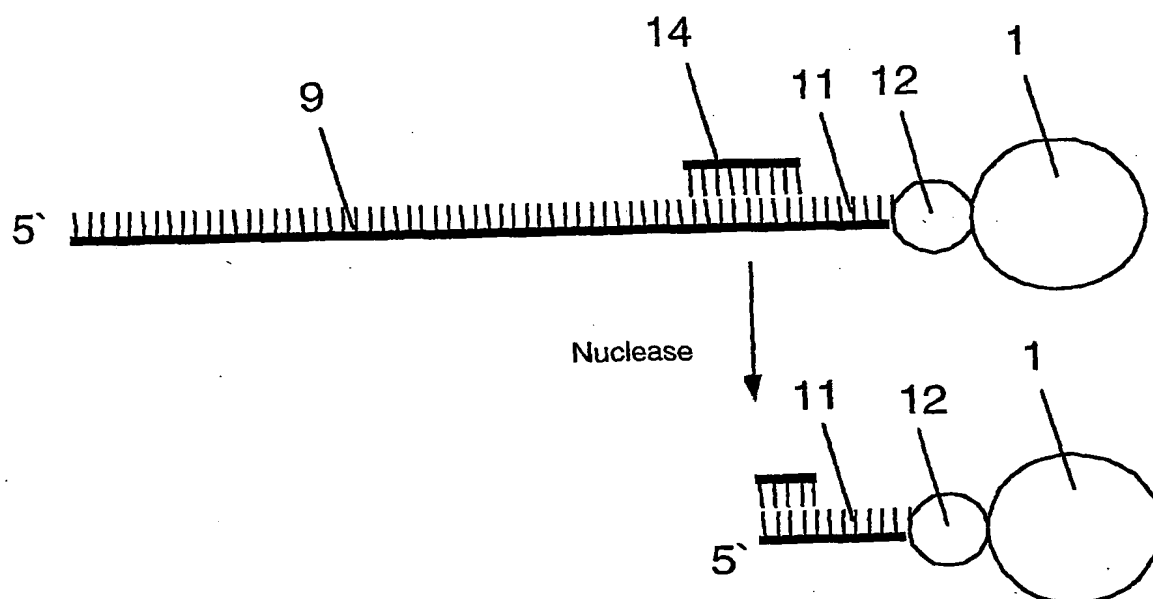


Fig. 5

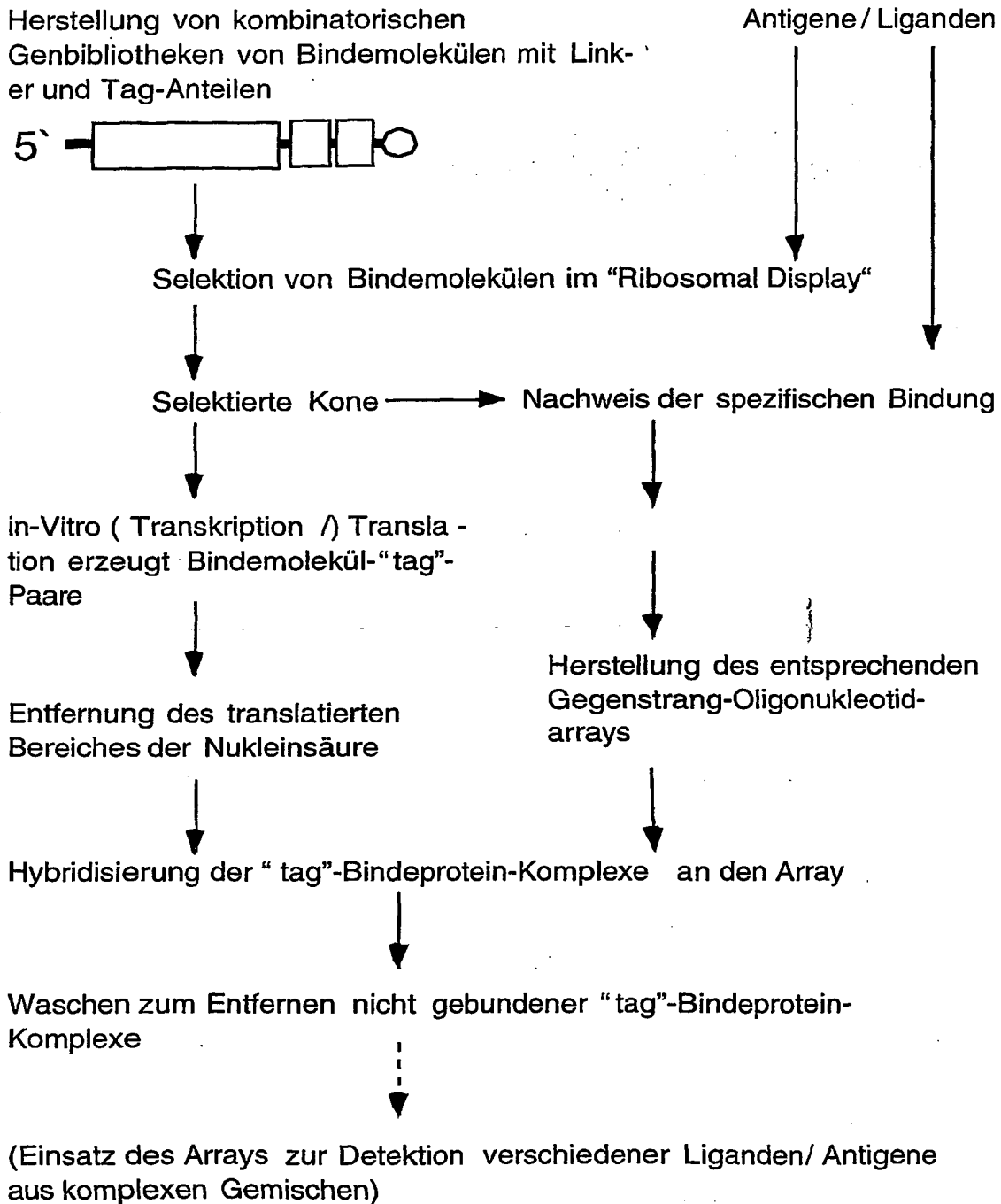


Fig. 6

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
27. März 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/025567 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/543

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/03414

(22) Internationales Anmeldedatum:  
13. September 2002 (13.09.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 45 226.8 13. September 2001 (13.09.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): BERNARD, André [DE/DE]; Hafengasse 11, 72070  
Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DÜBEL, Stefan  
[DE/DE]; Im Langgewann 6a, 69221 Dosenheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

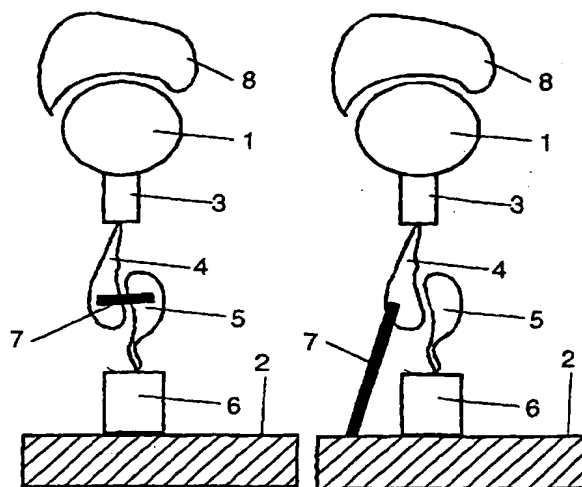
Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PRODUCTION OF SUPPORT-BONDED MOLECULES BY MEANS OF OLIGONUCLEOTIDE TAGS

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG VON TRÄGERGEBUNDENEN MOLEKÜLEN MITTELS OLIGONUCLEOTID-TAGS



(57) Abstract: The invention relates to a support for binding assays, whereby the assignment and coupling of trap molecules occurs on the solid phase by simple coating of a surface (support), pretreated in a determined manner, with a solution which contains a mixture of specially derivatised targets (trap molecules). The assignment of a particular molecule to a particular location on the support is guaranteed by a system of tagging molecules ("tags"), recognized by receptor molecules arranged in a determined manner on said support. These tags and their receptor molecules are typically nucleic acid fragments, but can also correspond to other molecule categories, in particular leucine zippers, antigen-antibody pairs or other protein pairs. The present invention also relates to a method for the production of such supports and trap molecules, as well as the application thereof after coupling.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/025567 A3



**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen****Recherchenberichts:**

13. November 2003

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**(57) Zusammenfassung:** Die Erfindung beschreibt Träger für Bindungsassays, bei dem die Zuordnung und Kopplung von Fängermolekülen an die Festphase durch einfaches Übersichten einer in bestimmter Weise vorbehandelten Fläche (Träger) mit einer Lösung geschieht, welche ein Gemisch speziell derivatisierter "Targets" (Fängermoleküle) enthält. Die Zuordnung eines bestimmten Moleküls zu einem bestimmten Platz auf dem Träger wird durch ein System von Markierungsmolekülen ("Tags") gewährleistet, welche von in bestimmter Form angeordneten Rezeptormolekülen auf dem Träger erkannt wird. Diese "Tags" und ihre Rezeptormoleküle sind typischerweise Nukleinsäurestücke, können aber auch andere Molekülklassen sein, insbesondere Leucin-zipper, Antikörper-Antigen-Paare oder andere Proteinpaaire. Die Erfindung beschreibt weiterhin Verfahren zur Herstellung solcher Träger und der Fängermoleküle, sowie deren Anwendung nach der Kopplung.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/03414

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 02 14860 A (DISCERNA LTD ; HE MINGYUE (GB); TAUSSIG MICHAEL JOHN (GB)) 21 February 2002 (2002-02-21) the whole document	1-3,5,6, 8-12
X	HE M ET AL: "Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and in situ immobilisation (PISA method)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 29, no. 15, 1 August 2001 (2001-08-01), page E73 XP002182708 ISSN: 0305-1048 the whole document	1-3,5,6, 8-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 July 2003

Date of mailing of the international search report

16/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diez Schlereth, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/03414

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 51773 A (PHYLOS INC) 14 October 1999 (1999-10-14) page 2, line 1 -page 6, line 20 ----	1,2,4-6, 8-11
X	WO 00 04382 A (ZYOMYX INC) 27 January 2000 (2000-01-27) page 15-18 page 23-24 page 35-36; figure 7 ----	1,2,4-11
X	WO 00 04389 A (ZYOMYX INC) 27 January 2000 (2000-01-27) claims 1-45; figure 7 ----	1,2,4-11
A	WO 98 54312 A (BABRAHAM INST ;HE MINGYUE (GB); TAUSSIG MICHAEL JOHN (GB)) 3 December 1998 (1998-12-03) abstract -----	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

DE02/03414

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: **Claims: 7-12 (in part)**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

**See supplemental Sheet for further information**

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The current Claims 7-12 relate to a disproportionately large number of possible devices, kits or methods. In fact they encompass so many alternatives that they appear unclear to the extent that it is impossible to conduct a meaningful search. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that can be considered clear, that is to a support according to Claims 1-6, method and kit for preparation thereof, and method of analysis of molecular bonding reactions by means of this support.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 02/03414

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0214860	A	21-02-2002	AU 7861301 A EP 1309861 A1 WO 0214860 A1	25-02-2002 14-05-2003 21-02-2002
WO 9951773	A	14-10-1999	AU 3463699 A CA 2323638 A1 EP 1068356 A1 JP 2002510505 T WO 9951773 A1 US 2002182597 A1	25-10-1999 14-10-1999 17-01-2001 09-04-2002 14-10-1999 05-12-2002
WO 0004382	A	27-01-2000	US 6406921 B1 AU 5102399 A AU 5102599 A CA 2337075 A1 CA 2337654 A1 EP 1097377 A2 EP 1097380 A1 JP 2002520618 T JP 2002520620 T US 2002132272 A1 WO 0004389 A2 WO 0004382 A1 US 2003003599 A1 US 2002106702 A1 US 2002110933 A1 US 6475808 B1 US 6329209 B1 US 6475809 B1 US 6365418 B1 US 2002119579 A1	18-06-2002 07-02-2000 07-02-2000 27-01-2000 27-01-2000 09-05-2001 09-05-2001 09-07-2002 09-07-2002 19-09-2002 27-01-2000 27-01-2000 02-01-2003 08-08-2002 15-08-2002 05-11-2002 11-12-2001 05-11-2002 02-04-2002 29-08-2002
WO 0004389	A	27-01-2000	US 6406921 B1 AU 5102399 A AU 5102599 A CA 2337075 A1 CA 2337654 A1 EP 1097377 A2 EP 1097380 A1 JP 2002520618 T JP 2002520620 T US 2002132272 A1 WO 0004389 A2 WO 0004382 A1 US 2003003599 A1 US 2002106702 A1 US 2002110933 A1 US 6475808 B1 US 6329209 B1 US 6475809 B1 US 6365418 B1 US 2002119579 A1	18-06-2002 07-02-2000 07-02-2000 27-01-2000 27-01-2000 09-05-2001 09-05-2001 09-07-2002 09-07-2002 19-09-2002 27-01-2000 27-01-2000 02-01-2003 08-08-2002 15-08-2002 05-11-2002 11-12-2001 05-11-2002 02-04-2002 29-08-2002
WO 9854312	A	03-12-1998	AU 725957 B2 AU 7666698 A EP 0985032 A1 WO 9854312 A1 JP 2002500514 T	26-10-2000 30-12-1998 15-03-2000 03-12-1998 08-01-2002

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/03414

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 02 14860 A (DISCERNA LTD ;HE MINGYUE (GB); TAUSSIG MICHAEL JOHN (GB)) 21. Februar 2002 (2002-02-21) das ganze Dokument	1-3,5,6, 8-12
X	HE M ET AL: "Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and in situ immobilisation (PISA method)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 29, Nr. 15, 1. August 2001 (2001-08-01), Seite E73 XP002182708 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument	1-3,5,6, 8-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Juli 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/07/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Diez Schlereth, D

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/03414

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 51773 A (PHYLOS INC) 14. Oktober 1999 (1999-10-14) Seite 2, Zeile 1 -Seite 6, Zeile 20 -----	1,2,4-6, 8-11
X	WO 00 04382 A (ZYOMYX INC) 27. Januar 2000 (2000-01-27) Seite 15-18 Seite 23-24 Seite 35-36; Abbildung 7 -----	1,2,4-11
X	WO 00 04389 A (ZYOMYX INC) 27. Januar 2000 (2000-01-27) Ansprüche 1-45; Abbildung 7 -----	1,2,4-11
A	WO 98 54312 A (BABRAHAM INST ;HE MINGYUE (GB); TAUSSIG MICHAEL JOHN (GB)) 3. Dezember 1998 (1998-12-03) Zusammenfassung -----	1-12



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen  
PCT/DE 02/03414

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr. 7-12 (teilweise)  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
  
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 7-12 (teilweise)

Die geltenden Patentansprüche 7-12 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Geräte/Kits/Verfahren. In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar gelten können, nämlich auf einen Träger gemäss den Ansprüchen 1-6, Verfahren und Kit zu dessen Herstellung und Verfahren zur Analyse von molekularen Bindungsreaktionen mittels diesem Träger.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/03414

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0214860	A	21-02-2002	AU 7861301 A	25-02-2002
			EP 1309861 A1	14-05-2003
			WO 0214860 A1	21-02-2002
WO 9951773	A	14-10-1999	AU 3463699 A	25-10-1999
			CA 2323638 A1	14-10-1999
			EP 1068356 A1	17-01-2001
			JP 2002510505 T	09-04-2002
			WO 9951773 A1	14-10-1999
			US 2002182597 A1	05-12-2002
WO 0004382	A	27-01-2000	US 6406921 B1	18-06-2002
			AU 5102399 A	07-02-2000
			AU 5102599 A	07-02-2000
			CA 2337075 A1	27-01-2000
			CA 2337654 A1	27-01-2000
			EP 1097377 A2	09-05-2001
			EP 1097380 A1	09-05-2001
			JP 2002520618 T	09-07-2002
			JP 2002520620 T	09-07-2002
			US 2002132272 A1	19-09-2002
			WO 0004389 A2	27-01-2000
			WO 0004382 A1	27-01-2000
			US 2003003599 A1	02-01-2003
			US 2002106702 A1	08-08-2002
			US 2002110933 A1	15-08-2002
			US 6475808 B1	05-11-2002
			US 6329209 B1	11-12-2001
			US 6475809 B1	05-11-2002
			US 6365418 B1	02-04-2002
			US 2002119579 A1	29-08-2002
WO 0004389	A	27-01-2000	US 6406921 B1	18-06-2002
			AU 5102399 A	07-02-2000
			AU 5102599 A	07-02-2000
			CA 2337075 A1	27-01-2000
			CA 2337654 A1	27-01-2000
			EP 1097377 A2	09-05-2001
			EP 1097380 A1	09-05-2001
			JP 2002520618 T	09-07-2002
			JP 2002520620 T	09-07-2002
			US 2002132272 A1	19-09-2002
			WO 0004389 A2	27-01-2000
			WO 0004382 A1	27-01-2000
			US 2003003599 A1	02-01-2003
			US 2002106702 A1	08-08-2002
			US 2002110933 A1	15-08-2002
			US 6475808 B1	05-11-2002
			US 6329209 B1	11-12-2001
			US 6475809 B1	05-11-2002
			US 6365418 B1	02-04-2002
			US 2002119579 A1	29-08-2002
WO 9854312	A	03-12-1998	AU 725957 B2	26-10-2000
			AU 7666698 A	30-12-1998
			EP 0985032 A1	15-03-2000
			WO 9854312 A1	03-12-1998
			JP 2002500514 T	08-01-2002